

⑧ 公表 平成1年(1989)11月9日

⑨ Int. Cl. <sup>4</sup>	⑩ 発明記号	⑪ 庁内整理番号	⑫ 審査請求 未請求	⑬ 予備審査請求 未請求	⑭ 部門(区分)
C 12 N 15/00		8717-4B			1 (1)
		K-7421-4B			
C 12 P 21/00		C-6712-4B			(全 14 頁)

⑯ 発明の名称 酵母ベクター

⑰ 特 願 昭63-502934

⑱ 説明文提出日 昭63(1988)12月8日

⑲ 出 願 昭63(1988)4月8日

⑳ 国 際 出 願 PCT/GB88/00276

㉑ 国際公開番号 WO88/08027

㉒ 国際公開日 昭63(1988)10月20日

優先権主張 ㉓ 1987年4月9日 ㉔ イギリス(GB) ㉕ 8708495

⑳ 発 明 者 ヒンクリツフエ, エドワード イギリス国 ノッティンガムシャー, パートン ジョーイル, ラムプ  
リイ レーン 16

㉑ 出 願 人 デルタ バイオテクノロジー イギリス国 エヌジー7 1エフデュー, ノッティンガム, カース  
リミテッド ル プールバード, カースル コート (番地なし)

㉒ 代 理 人 弁護士 浅 村 皓 外3名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), BR, CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特  
許), GB, GB(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域  
特許)

最終頁に続く

# 図 示 の 範 囲

1. 組換えによつて与えられる DNA 配列、その1対  
が同じ方向性を有し他の2対が逆の方向性を有する  
個の2 kb PFLP 組換え部位、及び目的とする蛋白質又  
はペプチドをコードする DNA 配列を含むベクターであ  
つて、上記組換えによつて与えられる DNA 配列が上記  
同じ方向性を有する1対の2 kb PFLP 組換え部位の間  
にある2 kb プラスミドベクター。

2. 選択マーカー DNA 配列を含む請求の範囲第1項  
記載の2 kb プラスミドベクター。

3. (i)バクテリア宿主中でのベクターの増殖に必要  
なバクテリアプラスミド DNA 配列; (ii)エキストラ 2 kb  
PFLP 組換え部位; (iii)目的とする蛋白質又はペプチドを  
コードする DNA 配列; 及び細胞形態質転換用の選択マ  
ーカー DNA 配列を保持する完全2 kb プラスミドであ  
つて、2 kb プラスミドの2つの逆方向反復配列の1  
つの配列内の制限酵素部位に上記バクテリアプラスミ  
ド DNA が存在し且つ上記エキストラ PFLP 組換え部位が  
作原されており、上記エキストラ PFLP 組換え部位は上  
記逆方向反復配列の1つの配列内の内因性 PFLP 組換え  
部位に対して同じ方向性を有しており、上記バクテリア  
プラスミド DNA 配列はエキストラ PFLP 組換え部位と  
上記逆方向反復配列の1つの配列内の内因性 PFLP 組  
換え部位との間にある完全2 kb プラスミドを含む請求

の範囲第2項記載の2 kb プラスミドベクター。

4. 上記制限酵素部位がホモータ Xba I 部位である  
請求の範囲第3項記載の2 kb プラスミドベクター。

5. 全てのバクテリア DNA 配列が上記のようにエキ  
ストラ PFLP 組換え部位と内因性 PFLP 組換え部位との間  
にある請求の範囲第3項又は第4項記載の2 kb プラ  
スミドベクター。

6. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする  
DNA 配列が酵母細胞に発現する請求の範囲第1項  
から第5項のいずれか1項記載の2 kb プラスミドベ  
クター。

7. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする  
DNA 配列が、HSA をコードする DNA 配列であつて、  
該 DNA 配列はその5'末端が酵母において機能する分泌  
リーダー配列を介して酵母において機能する遺伝子プ  
ロモーターと融合しており、その5'末端が酵母におい  
て機能する転写ターミネーションシグナルに融合して  
いる請求の範囲第6項記載の2 kb プラスミドベクタ  
ー。

8. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする  
DNA 配列が、その5'末端が GAL / CYC1または GAL / PGK ハ  
イブリッドプロモーターと融合しておりその5'末端が  
酵母において機能する転写ターミネーションシグナル  
に融合している KMT - HSA 遺伝子である請求の範囲第  
6項記載の2 kb プラスミドベクター。

9. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする遺伝子が、DEK-遺伝子、あるいは、その近縁性が酵母において発現する分断リーダー配列を介して酵母において発現する遺伝子プロモーターに結合しておりその近縁性が酵母において発現する転写ターミネーションシグナルに結合している *Saccharomyces cerevisiae* の  $\mu$ -グルカナーゼをコードする DNA 配列である請求の範囲第1項から第5項のいずれか1項記載の 2  $\mu$  プラスミドベクター。

10. 添付した第3図の pSAC3 の配置を實質的に有する請求の範囲第1項記載の 2  $\mu$  プラスミドベクター。

11. 請求の範囲第1項から第10項のいずれか1項記載の 2  $\mu$  プラスミドベクターの製造法であつて、  
(i) 酵母形質転換法を試験するための DNA 配列；(ii) 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列；及び (iii) (iv) バクテリア内でベクターの増殖を可能にするバクテリアプラスミド DNA と (v) FLP 認識部位のエレメントを含む挿入用 DNA 配列を、ユニーク Xba I 認識部位がベクター内に作成され且つ互いに逆の方向性を有する2つの FLP 認識部位の間に上記バクテリアプラスミド DNA がはさまれるように、挿入用 DNA 配列を完全 2  $\mu$  プラスミドに挿入することを含む上記の製造法。

12. 上記挿入用 DNA 配列を内臓性 FLP 認識部位のユニーク Xba I 部位に挿入し、挿入用 DNA 配列の一

方の末端に 2  $\mu$  プラスミドの複製配列の1部を有し、他方の末端に 2  $\mu$  プラスミドの複製配列の残りの部分を有する請求の範囲第1項記載の製造法。

13. 酵母に対して両側の蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列を含む、バクテリア DNA は含まない 2  $\mu$  プラスミドベクター。

14. 請求の範囲第1項から第10項のいずれか1項又は第13項記載の 2  $\mu$  プラスミドベクターで形質転換された発酵用酵母又は実験室用酵母。

15. 請求の範囲第14項記載の酵母を発酵することによつて得られる目的とする蛋白質又はペプチド。

16. 目的とする遺伝子が *Sac D* 1 部位に置換時に又は同時に挿入されている 2  $\mu$  プラスミドベクター。

## 明 細 書

### 酵母ベクター

本発明は、酵母、特に *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子工学に関する。

形質転換と言われる工程によつて、<sup>異</sup>種 DNA が酵母細胞に取込まれ、次いで遺伝的に継承されて該 DNA の発現が行なわれる。形質転換についての最初の報告は 1970 年代の後半に行なわれ、その時の形質転換は、酵母の細胞壁を酵素の作用によつて除いてプロトプラストを得、これに DNA を加える方法を用いるものであつた (Hinnen et al., 1973; Beggs, 1973)。最近ではインダクト酵母細胞を用いた形質転換が証明されている (Hinnen et al., 1983)。

酵母は適当なプラスミドを用いて形質転換することができ、この目的のために通常、“シャトルベクター”として構築されたプラスミドが使用されており、このシャトルベクターは *Escherichia coli* あるいは酵母のいずれにおいても増殖することができる (Hinnen et al., 1973; Beggs, 1973; Struhl et al., 1979)。

pBR 322 (Bolivar, 1973) などの *E. coli* プラスミド DNA 配列が *E. coli* 中に取込まれることによつて *E. coli* 中でのベクター DNA の量産が促進され、そ

の結果酵母の形質転換を効率良く行なうことができる。

酵母形質転換に一般的に使用されているプラスミドベクターは次の2つに大別される。即ち、(i) DNA 複製オリジンを有しているために、クロモソーム DNA に依存することなく自己を維持することが出来る複製ベクター；及び(ii)クロモソーム DNA と組換えを經こし、宿主細胞中の組換え DNA として複製し自己を維持するインテグレートベクターの2つである。複製ベクターは更に、(a)酵母の同値 2  $\mu$  プラスミドから得られる DNA 複製オリジンを含む 2  $\mu$  由来プラスミドベクター；(b)酵母のクロモソーム DNA から得られる見掛けの複製オリジンを含む自己複製ベクター；及び(c)上記の DNA 複製オリジンの1つと更にセントロメアを含むことが知られている酵母クロモソーム DNA 配列を有するセントロメアプラスミド (CEM) に分けられる。

上記したベクターで有効に酵母を形質転換するためには、組換え DNA を保持する形質転換体を同定して選択することが必要である。この選択は、ベクター DNA 内に識別可能な表現型を有する遺伝子を導入することによつて達成される。実験室で酵母を形質転換するのに使用するベクターの場合には、LEU 2, URA 3, TRP 1 (Hinnen et al., 1973; Beggs, 1973; Gerbaut et al., 1979) などの原栄養性遺伝子が通常使用され、これらは宿主の栄養要求性における欠損を<sup>補</sup>補するよう作用する。しかしながら、発酵用

酵母及び他の工業用途に用いられる酵母はしばしば倍數体であるため栄養要求性を示さず、従つて強力な選択因子に基つた選択系を利用することが必要である。この点に関連して、各種の耐性を発揮する遺伝子を保持した2  $\mu$ m 由来複製プラスミドベクターが報告されている。即ち、(i) 0.418 (Jinico et al., 1980; Wobbe et al., 1983)、ハイグロマイシンB (Gris et al., 1983)、クロラムフェニコール (Cobos et al., 1980; Hedfield et al., 1986) などの抗生物質に対して；及び(ii) 除草剤スルホメチルメチル (Folco et al., 1985)、コンパクテン (Kido et al., 1983)、銅 (Hedderon et al., 1985) などの他の毒性物質に対して耐性を発揮する遺伝子を用いた例がある。

酵母中で組換え遺伝子が安定に継承されるか否かは、形質転換に用いた酵母ベクターのタイプに依つてゐる。前記した2つのタイプのベクターのうちで安定なベクターはインテグレートベクターである。酵母のインテグレート形質転換の原理及び実験については文献 (Botstein & Davis, 1982; Winston et al., 1983; Orr - Weaver et al., 1983; Forthofer, 1983) に記載されている。一般にインテグレート形質転換は比較的に効率が低く、菌懸液インテグレートプラスミドの場合にはDNA 1  $\mu$ g 当り約1-10個の形質転換体を得られることが報告されている。

プラスミドは細胞1個当り1又は2コピーの割合いで存在し (Clarke & Carbon, 1980)、1世代当り必ずかに1%が失われるにすぎない (Walmsley et al., 1983)。キメラ2  $\mu$ m 由来プラスミドは、宿主の快及び該プラスミド中に存在する2  $\mu$ m DNA 配列に依つて変種の程度の遺伝的安定性を示す。

2  $\mu$ m プラスミドは細胞の核に存在していることが知られている (Nelson & Fargnoli, 1979; Livingston & Hulse, 1979; Seifry et al., 1980; Takeo et al., 1980; Sigurdson et al., 1981) が、メンデルの方法のように遺伝されない (Livingston, 1977)。2  $\mu$ m プラスミドを持たない細胞 (core) が、細胞1当り2  $\mu$ m プラスミドの平均コピー数が50である半數体酵母集団から1世代当り0.001%と0.01%の割合いで発生することが示されている (Fletcher & Cox, 1983)。このような低レベルの遺伝的不安定性の原因を説明するものとして、2  $\mu$ m プラスミドは通常の成長条件下で細胞に対して均等な割合を有していないことが考えられる (Broach, 1981; Fletcher & Cox, 1983; Sigurdson et al., 1981)。しかしながら、2  $\mu$ m プラスミドを有している株について2  $\mu$ m プラスミドが成長速度に対しておずか及が効果を及ぼしていることが報告されている (Walmsley et al., 1983)。S. cerevisiae の各種の株を分析した所、発芽用酵母

(Monaco et al., 1979; Hicks et al., 1979) にもかかわらず、酵母クロモソームDNAと相同性を有するアリー末端を持つ線状DNAは高い効率 (100-1000倍) で酵母を形質転換し、形質転換に用いたDNAは一般に複製部位に対して相同性を有する配列中に組込まれる (Orr - Weaver et al., 1981)。従つて、適切な制限酵素を用いてベクターDNAを断断することによつて、形質転換の効率を高め、クロモソームのインテグレート部位を定めることが可能である。形質転換の効率が十分に高く、かつクロモソーム内に組込まれるターゲットDNA配列が、宿主細胞の代償に必要な遺伝子内に組込まれない場合には、発芽用酵母の遺伝子的モディファイケーションにインテグレート形質転換を用いることができる。最近、発芽用酵母に用いるインテグレート酵母ベクターについて報告されている (Yocco, 1985)。

インテグレートベクターは選択を受けずに遺伝的に高率に安定に継承されるが、複製ベクターはこれとは格違して不安定である。遺伝的に継承される安定性は用いる複製ベクターのタイプに依る。ARSプラスミドは高コピー数で存在し (細胞1個当り約20-50コピー)、より安定した傾向にあるが、1世代当り約10%以上の頻度で失われる (Kikuchi, 1983)。しかしながら、ARSプラスミドの安定性はセントロメアが結合することによつて上昇する。セントロメア

(Tubb, 1980; Aigle et al., 1984; Binccliffe & Daubney, 1986) などの酵母のほとんどの株に2  $\mu$ m プラスミドが存在していたことが報告されている (Clark - Walker & Miklos, 1974)。従つて、2  $\mu$ m プラスミドは常に存在しており、このことが本質的に高率の遺伝的安定性を有していることを示していると考えられている。

2  $\mu$ m プラスミドについての遺伝子分析及び分子分析の結果、2  $\mu$ m プラスミドの複製及び安定性に関して多くの情報が得られている (Volkers & Broach, 1987)。本質的にはこのプラスミドは6318塩基対の環状DNA分子からなつてゐる (Battley & Deebelson, 1980)。そしてこのプラスミドはユニークな二方向性のDNA複製オリジンを有しており (Newlee et al., 1981)、これがすべての2  $\mu$ m 由来ベクターの必須成分となつてゐる。2  $\mu$ m プラスミドは4つの遺伝子、即ちREP 1, REP 2, REP 3及びFLPを含んでおり、これらが細胞1個当りのコピー数を高く安定に維持するために必須とされている。REP 1とREP 2遺伝子はトランス作用蛋白質をコードしており、この蛋白質は、REP 3遺伝子座と相互に作用して協同して複製を促進し、細胞分裂の際に2  $\mu$ m プラスミドの分割が安定に行なわれるのを可能ならしめてゐると考えられている (Volkers & Broach, 1987)。この点に関して、REP 3遺伝子は、2  $\mu$ m プラスミド

の安定な分離を行なうシス作用遺伝子座として作用しており、 $\phi$ -モザイクセントロメアと類似の複製型を有している (Jeffrey et al., 1983; Kikuchi, 1983)。2  $\mu$ m プラスミドの重要な特徴は、2つの逆方向反復 DNA 配列 (それぞれ 559 塩基対) が存在することであり、この配列によつて環状分子が2つのユニーク領域に分離されている。逆方向反復 DNA 配列の間で分子内組換えが起こり、一方のユニーク領域が他のユニーク領域に対して逆方向となり、A 及び B と置かれるプラスミドの構造異性体が先じて *in vivo* で2つの異性体を有する混合集団が産生される (Beggs, 1978)。2つの逆方向反復配列間での組換えは、FLP と置かれる遺伝子の産生蛋白質によつて仲介され、FLP 蛋白質が逆方向反復領域内での高頻度の組換えを仲介することができる。この部位特異的組換えによつて、プラスミドコピー数の増幅が出現されていると考えられている (Futcher, 1986; Volkert & Breach, 1986; Som et al., 1986; Murray et al., 1987)。

それぞれの逆方向反復配列は、3つの DNA 反復配列サブユニット (第3図に三角形で示されている) を含んでおり、そのうちの2つの複製サブユニットはお互いに同じ方向性を有しており、他1つのサブユニットは逆方向であつても塩基対結合又はスベーター領域を介して他の2つのサブユニットのうちの1つに結合し

これらのベクターは、内因性のプラスミドの REP 1 及び REP 2 遺伝子によつてコードされる蛋白質をトランス作用蛋白質として用いる必要があるためである。

異種遺伝子を発現して商業的に重要なポリペプチドを高レベルで産出することのできる遺伝子的に修正された酵母を構築する場合に於て、通常、高コピー数の酵母ベクターを選択することが望ましい。2  $\mu$ m 由来ベクターは発現プラスミドとして用いるには非常に好適であることが証明されており、今日ではしばしば 2  $\mu$ m 由来ベクターが用いられている (Kingsman et al., 1985)。

欧州特許出願第 86303039.1 (公開番号 0201259A1、出願人ゲルマ・バイオテクノロジー Ltd) には、最初のビール発酵時期には異種遺伝子の発現が起こらず、酵母の量が蓄積されその後ビールから酵母を取り出すと異種蛋白質の合成が誘導されるように、工業用酵母株を遺伝子的に修正して発酵用酵母中で異種蛋白質を産生する方法が記載されている。かかる方法は、強力な選択マーカー CUP - 1 と修正ヒト血清蛋白質 B - メチオニルアラニン (Met - HBA) をコードする遺伝子とを有する 2  $\mu$ m 由来ベクターであつて該蛋白質の発現がガラクトース誘導プロモーターによつて転写レベルで調節されているベクターで、発酵用酵母を形態転換することによつて達成される。上記の方法の実施期間中に、異種蛋白質の合成収量を

ている。このスベーター領域はユニーク Xba 1 部位を有しており、FLP 遺伝子の生成物を認識しそしてその生成物によつてその末端が切断される。それに隣接している配列は、他の逆方向反復配列に対応する配列に対して相同性を有しており、従つて末端が切断された後に正確に組換えが行なわれる。Andrews らによつて、80bp、スベーター領域を含む 74 塩基対の配列が FLP 部位特異的組換えには最低限必要であることが見出された (Andrews et al., 1985)。

2  $\mu$ m プラスミドの複製系に基づいた静態ベクターは、2  $\mu$ m プラスミドの複製に必須ではない領域に異種 DNA 配列を挿入することによつて構築される (Beggs, 1981)。このようなベクターには基本的に2つのタイプがある。即ち、(i) 全 2  $\mu$ m ベクター及び(ii) 2  $\mu$ m オリジンベクターである。前者の場合には、2  $\mu$ m ベクターの全てを有しており、そこには *colli* プラスミド DNA などの各種の異種配列が挿入されている。このように挿入されたプラスミドは、*Coli*<sup>+</sup> (2  $\mu$ m 含有) 及び *Coli*<sup>-</sup> (2  $\mu$ m 欠損) 宿主のいずれにおいても、高い遺伝的安定性を有しており高いコピー数で維持される。他方後者の 2  $\mu$ m オリジンベクターは、通常、2  $\mu$ m の DNA 複製オリジンと 2  $\mu$ m の 5' 塩基対反復配列のシングルコピーを有する最少 DNA 配列を持つのみであつて、このようなベクターは *Coli*<sup>+</sup> 宿主株でしか維持できない。何故なら、安定に維持されるためには、

最大にするためには次のことを実施するのが必要である。即ち、(i) 発現される遺伝子 (Met - HBA をコードする) の高コピー数；(ii) 非選択的な培養条件下において目的とする遺伝子の遺伝的安定性が高いこと；(iii) 発酵用酵母に導入される組換え遺伝子は、酵母及び該酵母のビール並びに異種蛋白質の生産能に有害な効果を与えないこと；及び(iv) 酵母中に存在する組換え遺伝子は、出来る限り、目的する遺伝子及びそれに隣接する調節遺伝子に限るべきであること、である。上記間には特に重要であり、通常の発酵用酵母の培養メディアム、即ちポプが添加された麦芽抽出物に銅イオンなどの毒性物質を添加することは望ましくなくまた実用的でない。銅イオンを添加する場合に於ては、工程コストが上昇し、第1の発酵生産物であるビールの質に有害で許容し得ない効果を与えることになる。上記例に照しては、遺伝子的に修正された酵母は、組換えプラスミドのベクター由来の配列部分に起因する配列などの余分な DNA 配列を有していないのが望ましい。

本発明者の出願であつて E P - A - 251744 として公開された明細書には、目的する DNA 配列を含有する相同性 2  $\mu$ m プラスミド DNA 配列の2つのコピーが同じ方向性を有しているインテグレーションベクターを構築し、このベクターで酵母を形態転換し、次いで得られる形態転換酵母から、目的とする DNA 配列が取り出されて修正された内因性 2  $\mu$ m プラスミドを保持する

細胞を単離することによつて、内因性 2  $\mu$ m プラスミドに目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列を導入して、酵母細胞を修正する方法が記載されている。インテグレイションベクター自体は、形質転換酵母細胞中で存続できない。相同性 2  $\mu$ m プラスミド DNA 配列は、通常はそうではないが、2  $\mu$ m プラスミド反復配列のコピーであつてもよい。

本発明者は、修正された 2  $\mu$ m プラスミドを導入することによつて酵母細胞を形質転換することのできる、上記明細書に記載された方法の実施を見出した。

本発明の方法では、使用するプラスミドベクターは、2 つの同じ方向性を有している相同性 2  $\mu$ m プラスミド DNA FLP 組換え部位の間に導入されているバクテリア中でのベクターの増殖を可能にする DNA 配列、目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列であつて必ずしも必要ではないが好ましくは酵母細胞内での異種の DNA 配列、及び好ましくは選択マーカー DNA 配列を含むベクターである。本発明の 2  $\mu$ m プラスミドベクターは、FLP 組換え部位の 3 つのコピーを有しており、その 2 列は同じ方向性を有しており、他の 2 列は逆の方向性を有している。このような構成を有するプラスミドベクターで酵母を形質転換すると、バクテリア中でのベクターの増殖を可能にする DNA 配列は自然に失われ、プラスミドベクターは、形質転換酵母の内因性 2  $\mu$ m プラスミドと置換し得る修正 2  $\mu$ m プラスミド

本発明の 2  $\mu$ m 由来ダイスインテグレイションベクターは、実験室及び工業用のいずれの酵母も形質転換できるとが見出された。このベクターは、細胞 1 個当たり高コピー数で維持され且つ非常に高い遺伝的安定性を有している。更には、これまで報告されている他の 2  $\mu$ m 由来ベクターと異なつて、本発明のダイスインテグレイションベクターは、酵母が形質転換される際に、バクテリアプラスミド DNA 配列が自然に除去されるように構築されている。かくして、2  $\mu$ m プラスミドを導入された目的とする遺伝子が、非選択的生育条件においても余分なバクテリアプラスミド DNA 配列が存在することなく細胞 1 個当たりのコピー数が高い状態で維持される発酵用酵母の遺伝子的修正株が構築できる。このようなベクターを用いて遺伝子的に修正された発酵用酵母を構築することにより、目的とする遺伝子のみが発酵用酵母の次の世代まで安定に維持され、これによつて、付加的な DNA 配列が酵母の挙動及び／又は酵母によつて産生される物質の量や質に有害に与える有害な効果を除去できる。

実際には、目的とする遺伝子はいずれの系換え遺伝子であつてもよく、また酵母に対して異種のもので同種のものでよい。本発明のダイスインテグレイションベクターは例えば、発酵用酵母の MEL-18A 遺伝子を安定にインテグレートするのに用いることができ、この遺伝子は、例えば P-A-~~4719~~号明細

となる。この種のプラスミドベクターを以後ダイスインテグレイションベクターという。このようなベクターで形質転換された酵母は、目的とする遺伝子を含むバクテリア DNA は含まない修正 2  $\mu$ m プラスミドの多数の染色体外コピーを有しており、これらは非選択的生育条件下において遺伝的に安定に継承されることが見出されている。

1986 年秋の第 13 回目の「酵母遺伝子及び分子生物学」についてのコンファレンスで、Bruschi は、2  $\mu$ m 由来プラスミドの組換えによつてバクテリア DNA 配列が除去されることを報告したが、それは、その系が DNA 分子の構造と機能との関係を研究するのに用いることができることを示唆したにすぎない。本発明者は、同様の系が、予期せぬ安定性を有する有利な発酵ベクターの構築に用いることができることを見出した。

本明細書で用いる「FLP 組換え部位」とは、FLP 遺伝子生産物との相互作用の結果、組換えが可能な部位のいずれをも意味する。もし Andrew らの知見(1983)が正しいならば、FLP 組換え部位は、通常彼らによつて同定された 74 b.p 配列をその最少配列として有している。実際は、全反復配列の 599 塩基対以上を含んでいたとしても何んらの特異もない。

本明細書に記載された方法に従つてホスホグリセレートキナーゼプロモーター (PGK) により、あるいは例えば EP-A-201239 号明細書に記載された GAL10 / CYC1 ハイブリッドプロモーターあるいは EP-A-258067 号明細書に記載された GAL / PGK プロモーターなどの調節遺伝子プロモーターによつて発現される。

本発明の系によつて安定に維持される付加的な遺伝子は、例えば、発酵用酵母での細胞外グルコアミラーゼ酵素の産生を規定する *Saccharomyces diastaticus* の DEX 1 遺伝子、発酵用酵母でのエンド-1,2- $\alpha$ -D-グルコナーゼの産生を規定する *Bacillus subtilis* の  $\beta$ -グルコナーゼ遺伝子 (Minneliff & Box, 1985) などである。このような遺伝子は、遺伝子の発現レベルをコントロールし及び／又は遺伝子によつて産生される蛋白質が発酵用酵母から分泌されるように、最初に遺伝子的に修正することができる。

本発明の新しいダイスインテグレイションベクターは、EP-A-201239 号明細書に記載された工程に用いられるのが特に有利である。なぜなら、この工程によれば、目的とする遺伝子は酵母の発酵の間は発現されずまた酵母の通常の生育条件下でも発現されず、発酵後の工程で発現されるように調節されているためである。従つて、目的とする遺伝子の高レベル発現の



時期と、細胞増殖によつて酵母のバイオマスが合成される時期とが分離されており、これによつて、プラスミド安定性に及ぼす遺伝子発現の影響を最少にすることが出来る。

本発明のベクターは、(i)バクテリア宿主中での当該ベクターの増殖に必要なバクテリアプラスミドDNA配列；(ii)エキストラ2 $\mu$ m FLP組換え部位；(iii)目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列；及び(iv)酵母形質転換用の選択マーカーDNA配列を有する完全2 $\mu$ mプラスミドを含むダイスインテグレーションベクター（前記定義の通り）であつて、2 $\mu$ mプラスミドの2つの逆方向反復配列の1つの配列内の制限酵素部位に該バクテリアプラスミドDNA配列が導入し、かつエキストラ2 $\mu$ m FLP組換え部位が作服されており、該逆方向反復配列の1つの配列内の内因性FLP組換え部位に対して同じ方向性を有して該エキストラFLP組換え部位が存在しており、該エキストラFLP組換え部位と該逆方向反復配列の1つの配列内の内因性FLP組換え部位との間に該バクテリアプラスミドDNA配列がはさまれているダイスインテグレーションベクターが好ましい。

このような本発明の好ましいダイスインテグレーションベクターは、1つもしくはそれ以上のバクテリアプラスミドDNA配列と、2 $\mu$ mプラスミドから得られる74塩基対FLP組換え部位のエキストラコピーとが

ととから、本発明のベクターは完全2 $\mu$ mプラスミドに基づくのが好ましい。しかしながら、本発明のベクターが内因性2 $\mu$ mプラスミドと共に存在する場合には、該ベクター中にはREP 1、REP 2、REP 3、FLPなどの遺伝子は、これら遺伝子の生産物であるトランス作用蛋白質として供給される。これらのすべては複製のオリジンに必要なものである。

以下に詳述するように、バクテリアDNA配列を有する挿入用DNA配列は、そのそれぞれの來源に反復配列のそれぞれの部分を保持していてもよく、この場合には該挿入用DNA配列は、内因性組換え部位が破壊されて同時に2つの新しいFLP組換え部位が形成されるように内因性反復配列内に挿入され、このFLP組換え部位はそれぞれ内因性組換え部位と挿入された挿入用DNAの相補的部分とからなっている。あるいはまた、完全なFLP組換え部位を挿入用DNA配列の一端に導入し、次いで得られるDNA配列を、バクテリアDNA配列が内因性反復配列と挿入用反復配列との間に存在するように、内因性反復配列に隣接して又は被れて挿入される。挿入用DNA配列が、内因性反復配列から離れた位置に挿入される場合には、内因性反復配列と挿入された反復DNA配列との間の内因性DNA配列はバクテリアDNA配列とともに除去される。従つてこのDNA配列が必要な場合には、挿入用反復配列の内因性反復配列から離れた側にく好ましくは挿入されるDNA配列上の

挿入された完全2 $\mu$ mプラスミドからなる。更には、酵母形質転換用の選択マーカー例えばCUP-1と共に選択に用いた目的とする遺伝子が、2 $\mu$ mプラスミドの第2の部位に挿入されている。バクテリアプラスミドDNA配列と酵母DNA反復配列とが、完全2 $\mu$ mプラスミドの2つの逆方向反復配列の1つのコピー内の例えばXba I部位に挿入されている。DNA反復配列の正しい方向は、プラスミドの機能に必須であり、例えばE. coliでの増殖に必要なバクテリアプラスミド配列は、2 $\mu$ mプラスミドのFLP組換え部位の同じ方向性を有する2つのコピーの間には置かれるようにプラスミドが複製される。DNA配列の配置は、第3図に詳しく説明されている。このように複製することによつて、プラスミドを酵母に導入した時に2つの同じ方向性を有するDNA反復配列の間で密着する部位特異的組換えによりプラスミドから除かれるようなDNA領域内に、バクテリアプラスミドDNA配列を配置することが出来る。この部位特異的組換えは、2 $\mu$ mプラスミドのFLP遺伝子生産物によつて仲介され、この生産物は、*cir<sup>+</sup>*細胞を形質転換した場合には酵母の内因性2 $\mu$ mプラスミドによつて供給され、*cir<sup>-</sup>*細胞を形質転換した場合にはダイスインテグレーションベクター自身によつて供給される。本発明のベクターは、形質転換酵母の内因性2 $\mu$ mプラスミドを補うのに使用することができ、また組換えは*cir<sup>-</sup>*細胞の方が速く起こる

更にこのDNA配列の1つのコピーを置く必要がある。

目的とする遺伝子を挿入するインテグラル2 $\mu$ mプラスミドの部位は、該挿入によるプラスミドコピー数及び遺伝的安定性への効果が最少になるように選択される。従つて、REP 1、REP 2、REP 3及びFLP遺伝子に対して害を与えないような部位に目的とする遺伝子を挿入するのが好ましく、特に、プラスミドを酵母の*cir<sup>-</sup>*細胞株の形質転換に用いる場合にはそのようにするのが好ましい。

本発明のダイスインテグレーションベクターの1つの有利な特徴点は、それを*cir<sup>+</sup>*酵母株に導入した場合にはそれがインテグラル2 $\mu$ mプラスミドを有しているためにバクテリアプラスミド配列が除去される間または除去された後にそれが内因性2 $\mu$ mプラスミドを補うことができることである。同様の状態については酵母の*cir<sup>+</sup>*細胞株に導入された完全2 $\mu$ mベクターについても報告されている（Harford & Pelton, 1987）。本発明のダイスインテグレーションベクターは、酵母株の内因性2 $\mu$ mプラスミドを補うために用いることもできる。

添付した図面においては以下のことが示されている。

図1図は、プラスミドpBA 412（Anders, et al., 1985）を示す。細い線は、バクテリアプラスミドpUC 9から誘導されるDNA配列を示し、太い細線の図は、FLP組換え部位を含む74塩基対DNAフラグメ

ントを示し、三角形は、それぞれのFLP認識部位内  
の3つの内部DNA反復配列の方向を示す（Andrews,  
et al., 1985）。

第2図は、プラスミドpSAC 112を示す。プラス  
ミドpSAC 112は、BamHI, PstI及びHindIII部  
位が除かれている以外はpEA 112と同じである。

第3図は、プラスミドpSAC 3を示す。太い線は、  
バクテリアプラスミドpUC9のDNA配列を示し、太い  
点線の図は、FLP認識部位を含む74塩基対DNA  
フラグメントを示し、細い線は2 kbプラスミドDNA  
配列を示し、三角形は、それぞれのFLP認識部位内  
の3つの内部DNA反復配列の方向を示す。

第4図は、プラスミドpSAC 3U1を示し、記号は第  
3図と同じである。

第5図は、pSAC 3U2のプラスミドマップを示し、  
記号は第3図と同じである。

第6図は、pSAC 3U0のプラスミドマップを示し、  
記号は第3図と同じである。

第7図は、pSAC 310のプラスミドマップを示し、  
記号は第3図と同じである。

第8図は、pSAC 3C1のプラスミドマップを示し、  
記号は第3図と同じである。

第9図は、半数体酵母の生育を示す実験に基いた  
図面であり、URA3及びバクテリアbla遺伝子の遺伝  
的安定性を示す。

Xba Iで開裂したpSAC 112に連結した。連結して  
得られるDNAをE. coli株AG1（NSL Enzymes Ltd.,  
Crawlington, Englandから入手した）に導入した。  
得られるアムピシリン耐性の形質転換体について、プ  
ラスミドpYT92（Storms, R.K. et al., 1979）  
から得た32Pラベル化2.2 kb塩基対EcoRIフラグ  
メントとのコロニーハイブリダイゼーションにより  
（GrunsteinとHogness, 1975）、2 kbプラス  
ミドに対する相同性をスクリーニングした。2 kbプ  
ラスミドに特異的なDNAプローブに対して相同性を示す  
コロニーを単離し、そのプラスミドDNAを制限酵素マ  
ッピング法により検定付けた。かくしてプラスミド  
pSAC 3を得た。

プラスミドpSAC 3を制限酵素Pst Iで開裂するこ  
とによつて、プラスミドpSAC 3U1（第4図）及び  
pSAC 3U2（第5図）を構築した。線状DNAを、  
0.3 mM dNTP（dATP, dTTP, dCTP及びdGTP）の存  
在下で70℃で10分間、T<sub>4</sub> DNAポリメラーゼで処  
理してプラント末端とした。DNAをフェノール：クロ  
ロホルムで抽出し、リゲーションを行なう前にエタノ  
ール沈殿付した。プラスミドpJDB 110（Gesser,  
1981）を、制限酵素Hind IIIで消化し、DNAフラ  
グメントを1 kbゲルのアガロースゲル電気泳動に付し  
た。酵母のURA3遺伝子を有する1.1 kb塩基対DNA  
フラグメントをゲルから単離し（Maniatis, et al.,

第10図は、32Pでラベル化したpSAC 3 DNAでア  
プローブした全酵母DNAのオートラジオグラフィーを示  
す。

以下に、本発明を実施例により説明する。

#### 実施例1

##### プラスミドの構築

プラスミドpEA 112（第1図, Andrews, et al.,  
1985）を、制限酵素BamHI及びHind IIIで同時に  
消化することによつてプラスミドpSAC 112（第2  
図）を構築した。線状プラスミドDNAを、0.3 mM  
dNTP（dATP, dTTP, dCTP, 及びdGTP）の存在下  
で70℃で10分間、DNAポリメラーゼI（クレノー）  
で処理した。DNAをフェノール：クロロホルムで抽出  
し、エタノール沈殿し、次いでT<sub>4</sub> DNAリガーゼの存  
在下で15℃で1晩インキュベートした。連結された  
DNAをE. coli株MC1061（CasadabanとCohen,  
1980）に導入し、得られる形質転換体からプラス  
ミドpSAC 112を単離し、BirboinとDoly（1980）  
の方法によつて同定し検定付けた。

以下のようにしてプラスミドpSAC 3（第3図）を  
構築した。Guertin等, et al.,（1974）に記載  
された方法と同様にしてDE1株から、酵母2 kbプ  
ラスミドDNAを単離した。複製した2 kbプラスミド  
DNAを、Maniatis, et al.,（1982）に記載され  
た方法と同様にして、制限酵素Xba Iで部分消化し、

1982）、0.3 mM dNTP（dATP, dTTP, dCTP及  
びdGTP）の存在下でDNAポリメラーゼI（クレノー）  
で処理した。1.1 kb塩基対Hind IIIフラグメントを  
フェノール：クロロホルムで抽出し、エタノール沈  
殿付し、上記で複製した線状pSAC 3 DNAとプラント  
末端で連結した。得られる連結DNAをE. coli株AG1  
に導入した。得られるアムピシリン耐性形質転換体に  
ついて、プラスミドpJDB 110から複製される1.1  
kb塩基対Hind IIIフラグメントの32Pラベル体を用  
いたコロニーハイブリダイゼーションにより  
（GrunsteinとHogness, 1975）、URA3遺伝子  
に対する相同性をスクリーニングした。URA3遺伝子  
プローブに対して相同性を示すコロニーから、プ  
ラスミドpSAC 3U1（第4図）及びpSAC 3U2（第5図）  
を単離した。また、URA3遺伝子を含有1.1 kb塩基  
対Hind III DNAフラグメントを、pSAC 3のニユータ  
Sna I部位及びSna B1部位にプラント末端で連結し  
て、pSAC 3U0（第6図）及びpSAC 310（第7図）  
と命名されたプラスミドをそれぞれ得た。

プラスミドpBT 13:1（Henderson, et al.,  
1985）から得られるCUP1遺伝子を保持する694  
塩基対Xba I・Kpn I DNAフラグメントを、pSAC 3  
のニユータPst I部位へプラント末端で連結すること  
によつて、プラスミドpSAC 3C1（第8図）を構築  
した。





表 1

pSAC301 及び pSAC302 で形質転換された S150-2Dc1P <sup>+</sup> と c1r <sup>0</sup> 酵母菌株の pSAC301 に対するハイブリダイゼーション		制限酵素フラグメント (ナノメートル)	
プラスミド DNA		NotI	XbaI
2 kb (内因性)		4.1 5.9 2.4 2.2	3.2 3.1
pSAC301 及び pSAC302 (インサート)		5.3 4.1 0.72	4.3 3.2 2.8
pSAC301 及び pSAC302 (分解した)		(5.0) 4.1 3.3 (2.4)	4.3 3.2
			10.2 7.4

全ての場合において、それらの制限型が失われていたことが観察された。即ち、pSAC300 及び pSAC310 は酵母の形質転換の際にバクテリアベクター DNA を除去することができる。この点に関して、プラスミド pSAC300 の場合では、S150-2B の c1r<sup>+</sup> 酵母菌株の bla<sup>+</sup> 形質転換体が無意に高い比率で生じることが観察された。このことについてはどのように説明すべきかは判らない。しかしながら、次の可能性がある。即ち、pSAC300 に URA<sup>+</sup> 遺伝子が挿入されたことによつて Bla<sup>+</sup> 形質転換がとられ、脱落している FLP 遺伝子の発現が無害を受け、その結果 FLP レコンビナーゼの発現が高くなった可能性がある。

プラスミド pSAC301 を、制限受体区発用酵母、即ち発酵用酵母の形質転換に用いることを考えた。即ち、Higuchi 及び Daubney (1986) に記載されている Bacc<sup>+</sup> マーダービール酵母 2B 11.3 を pSAC301 で形質転換した。次いで、得られる細胞形質転換体について、マーカーマーカープレートアッセイにより bla<sup>+</sup> 形質転換が存在するか否かをチェックした。テストした形質転換体の約 1/8 が bla<sup>+</sup> 細胞性を示し、このことは、発酵用酵母宿主においてプラスミド pSAC301 の in vivo 分解が起つたことを示している。

プラスミド pSAC300、pSAC310 及び pSAC301 の in vivo 分解について、実験型が失われた発酵用宿主株の分子上の特長付けを十分に行なうことによつて分

析コ内に示した数字は、分解したプラスミドが FLP による内部切断を受けた場合に生じるフラグメントを示すものである。

ハイブリダイゼーションの結果 (図 10 図) とその市販 (表 1) とを比較すると、それぞれの形質転換体において、同じ方向を有する FLP 認識部位内にあるバクテリアプラスミド DNA 配列の除去に相当する欠失を認識元プラスミドが受けたことが判る。更には、pSAC302 / 3 と命名された形質転換体の場合では、S150-2B 株の内因性 2 kb プラスミドはもはや存在していない。このことは、プラスミド pSAC302 で c1r<sup>+</sup> が形質転換されることによつて内因性 2 kb プラスミドが補なわれたことを示している。

更に、プラスミド pSAC301 と pSAC302 が酵母の形質転換の際にバクテリアプラスミド DNA 配列の除去を受けたことは、<sup>32</sup>P-ラベル化 pUC9 DNA (Vieira と Messing, 1982) に対する上記した DNA 断片物のハイブリダイゼーションからも判る。URA<sup>+</sup> bla<sup>+</sup> 形質転換体は、この DNA プローブに対してハイブリダイズしなかつた。

#### 酵母形質転換の際のプラスミド pSAC300、pSAC310 及び pSAC301 の分解

URA<sup>+</sup> プラスミド pSAC300 及び pSAC310 を用いて、S150-2B の c1r<sup>+</sup> 及び c1r<sup>0</sup> 酵母菌株を形質転換し、得られる形質転換体の URA<sup>+</sup> 及び bla<sup>+</sup> 発現量を調べた。

解が生じていることを確認した。即ち、上記した <sup>32</sup>P-pUC9 DNA に対して酵母全 DNA をハイブリダイズさせた所、bla<sup>+</sup> 酵母菌株については何人らの相同性も検出されなかつた。

#### " 分解 " 形質転換体のプラスミド安定性

pSAC301、pSAC302、pSAC300 及び pSAC310 の分解されたプラスミド酵母株を保持する S150-2B の c1r<sup>+</sup> 及び c1r<sup>0</sup> 株における URA<sup>+</sup> 発現量の遺伝的安定性を、2 株 x/v グルコースを含む YEP 中で非選択的に酵母を生産せしめ、同じ最少培地上にプレートし、次いでウラシルを欠いた最少培地にシブリカプレートすることによつて調べた。1 世代毎のプラスミド欠損パーセントを計算し、表 2 に示した。

表 2

#### 1 世代毎のプラスミド欠損パーセント

プラスミド酵母株 (分析されたベクター)	1 世代毎のプラスミド欠損パーセント	
	S150-2B c1r <sup>+</sup>	S150-2B c1r <sup>0</sup>
pSAC301	0.22	0.19
pSAC302	0.31	0.14
pSAC300	2.5	-
pSAC310	0	0.89

表2の結果から判るように、すべての分解された（ダイスインテグレートされた）ベクターは、 $8 \times 10^{-2}$  の  $\text{citr}^+$  及び  $\text{citr}^0$  酵母菌株中で不安定である。しかしながら、特に pSAC301、pSAC302 及び pSAC310 の不安定性のレベルは、 $8 \times 10^{-2}$  中で他の  $\text{URA}^+$  2  $\mu$ m 酵母菌株ベクター（Caslow et al., 1986）よりも少なくともワンオーダー低い。

pSAC3 の 2  $\mu$ m プラスミド部分のヌーク Eog I 部位は  $\text{URA}^+$  3 遺伝子を挿入することによって、pSAC301、pSAC302 及び pSAC310 から新導される分解されたプラスミド酵母体よりも安定性が低い分解されたプラスミド酵母体が得られることは証明される。従って、選択マーカーの挿入部位が、得られる分解されたプラスミド酵母体の安定性に対して大きな効果を与えることが明らかである。この点に関して、2  $\mu$ m プラスミドのヌーク Sna I 及び Pst I 部位が認識し遺伝子の導入に用いた遺伝子組を形成することが明らかである。何故なら、どのような部位への導入によってプラスミドの安定性が影響を受けるかわかるからである。

#### 発酵用酵母の「分解」形質転換体でのプラスミド安定性

SB 1 1.0 の pSAC301 形質転換体の分解されたプラスミド酵母体を有する分解形質転換体について、細胞世代別の安定性を調べた。上記したと同様にしてプ

ている（Rose et al., 1984）。この Sna I 部位を、適当な目的とする遺伝子を挿入するための置換子座として用いることができる。

目的とする遺伝子を直接的にあるいは間接的に挿入するために（例えば  $\text{URA}^+$  遺伝子を挿入し、次いでその Sna I 部位に目的とする遺伝子を挿入するよりな場合）Sna I 部位を用いることが望ましいか否かは、ベクターの分解に依っている。即ち、ベクターの DNA 配列の終端に依っており、このことが本発明の他の一つの局面を形成している。一般に、挿入された遺伝子から約 2 kb 領域、特に酵母の複製オリジン（ori）から離れた Sna I 部位側の 870 領域まで転写が行われるのを止めるのが望まれている。従って、挿入される配列は、(a) 目的とする遺伝子、(b) その ori 側に発現した部位上にあるプロモーター及び (c) 目的とする遺伝子の下流であつて血つ量目的とする遺伝子と STB 領域との間にある 5'-転写ターミネーターからなるのが望ましい。

#### 引用文献

- Aigle et al., (1984), Journal of the American Society of Brewing Chemists, 42, 1.  
 Andrews et al., (1985) Cell, 40, 795.  
 Boggs, (1978), Nature, 273, 104.

プラスミド安定性の実験を行なった所、非選択的培養条件下で 1 世代当たり 0.014 分のプラスミド欠損が誘起された。この結果から、pSAC301 の分解されたプラスミド酵母体は発酵用酵母株 SB 1 1.0 中で非常に安定であり、細胞 2  $\mu$ m 由来酵母ベクターについてこれまで観察されたことのない程度の安定性を有している。

#### 酵母中で目的とする遺伝子を安定に維持するためにダイスインテグレーションベクターを従用することができる

プラスミド pSAC3 はヌーク Pst I 部位及びヌーク Sna I 部位を有しており、これらのいずれに DNA 配列を挿入しても、酵母でのプラスミドの分解酵母体の複製型の安定性に別して悪い影響を及ぼさず、DNA 配列を挿入することができる。これらの部位は、目的とする遺伝子、例えば 8. dissociative の DEX-1 遺伝子及び酵母プロモーターで発現されるヒト血漿アルブミン遺伝子の導入のための置換子座として用いることができる。公知の方法を用いて、酵母形質転換体の選択マーカーとともにこのような遺伝子をこのようなヌーク置換子座に挿入することができる。あるいは、プラスミド pSAC301、pSAC302、pSAC310 及び pSAC301 は、目的とする遺伝子を挿入するための発酵体として用いることができる。この点に関して、プラスミド pSAC301、pSAC302 及び pSAC310 は、 $\text{URA}^+$  3 遺伝子の 3'-発現制御領域にヌーク Sna I 部位を有し

Boggs, (1981), in: "Molecular Genetics in Yeast" Alfred Benzon Symposium No: 16, Munksgaard, Copenhagen.

Birnboim & Doly, (1980), Nucleic Acids Research, 2, 1513.

Bolivar, (1978), Gene, 4, 121.

Bourgeois & Davis, (1982), in "The Molecular Biology of the Yeast, Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression", Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbour Laboratory, New York.

Broach & Hicks, (1980), Cell, 21, 501.

Casadaban & Cohen, (1980), Journal of Molecular Biology, 138, 179.

Cashmore, et al., (1986), Molecular and General Genetics, 203, 154.

Chevallier & Aigle, (1979), FEBS Letters, 108, 179.

Chevallier, et al., (1980), Gene, 11, 11.

Clarke & Carbon, (1980), Nature, 287, 504.

- Clark-Walker & Miklos, (1974), European Journal of Biochemistry, 41, 359.
- Cohen et al., (1980), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 1078.
- Falco & Dumas, (1985), Genetics, 109, 21.
- Futcher, (1986), Journal of Theoretical Biology, 119, 197.
- Futcher & Cox, (1983), Journal of Bacteriology, 154, 612.
- Gerbaud et al., (1979), Gene, 5, 233.
- Gritz et al., (1983), Gene, 25, 178.
- Granstein & Hogness, (1975), Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 72, 3961.
- Guarideau, et al., (1974), Biochemical Biophysics Research Communications, 61, 462.
- Hadfield, et al., (1986), Gene, 45, 149.
- Harford & Gathaye, (1985), DNA, 4, 80.
- Harford & Peters, (1987), Current Genetics, 11, 315.
- Kingsman, et al., (1985), Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 3, 377.
- Livingston, (1977), Genetics, 86, 73.
- Livingston & Hobbs, (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 3727.
- Mariello et al., (1982), in: "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbour, New York.
- Murray et al., (1987), The EMBO Journal, 6, 4205.
- Nelson & Pangman, (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 6515.
- Newlon, et al., (1981), IGN-UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, 22, 501.
- Orr-Weaver, et al., (1981), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 78, 6354.
- Orr-Weaver, et al., (1983), In "Methods in Enzymology", Eds. Wu, et al., 101, 228, Academic Press, New York.
- Rine, et al., (1983), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 80, 6750.
- Roscoe et al., (1984), Gene, 29, 133.
- Rothstein, (1983), In "Methods in Enzymology", Eds. Wu, et al., 101, 202, Academic Press, New York.
- Selig et al., (1980), Nucleic Acids Research, 8, 3371.
- Sigurdson et al., (1981), Molecular and General Genetics, 183, 59.
- Som et al., (1986), Cell, 52, 27.
- Stevens, et al., (1979), Journal of Bacteriology, 140, 73.
- Struhl et al., (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 1035.
- Taketo et al., (1980), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 3144.
- Tabb, (1980), Journal of the Institute of Brewing, 86, 73.
- Vieria & Messing, (1982), Gene, 19, 239.
- Sapley & Donelson, (1980), Nature, 286, 280.
- Henderson et al., (1985), Current Genetics, 9, 115.
- Sicks et al., (1979), Cold Spring Harbour Symposium Quantitative Biology, 43, 1305.
- Kitchliffe & Box (1985), Proceedings of the European Brewery Convention Congress, 20th, Helsinki, 267.
- Kitchliffe & Daubney (1986), Journal of the American Society of Brewing Chemists, 44, 98.
- Hansen et al., (1978), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 75, 1929.
- Ito et al., (1983), Journal of Bacteriology, 153, 163.
- Kyma, et al., (1982), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 79, 1578.
- Jayaram, et al., (1983), Cell, 34, 95.
- Jimenez et al., (1980), Nature, 287, 869.
- Kikuchi, (1983), Cell, 35, 487.

Volker & Broach, (1986), *Cell*, **46**, 541.

Volker & Broach, (1987), *In Press*.

Wainsley, *et al.*, (1985), *Molecular and General Genetics*, **192**, 561.

Webster & Dickson, (1983), *Gene*, **26**, 243.

Winston, *et al.*, (1983), *In "Methods in Enzymology"*, Eds. Wu, *et al.*, **101**, 211.

Wu, *et al.*, (1985), *In "UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology: Yeast Cell Biology"*, Ed. Hsiao, 323.

Yocum, (1985), 欧州特許出願 No 163491.

組換え能においては、同じ方向を向する2つのFLP認識部位のみと、希望しない例えばそれらの間にあるベクターDNA（例えば組換え部位のペアーによって分離されたプラスミドの2つの部分の短い配列として）とを結合するプラスミドを構築してもよい。組換え後は、このようなプラスミドは1個の組換え部位を有し、従って通常の2<sup>nd</sup>組換えを起こさず、A型とB型の混合集団とならない。このようなプラスミドは上述したプラスミドよりも不安定であるが、本発明の1局面を形成しそのものもクレームされる。

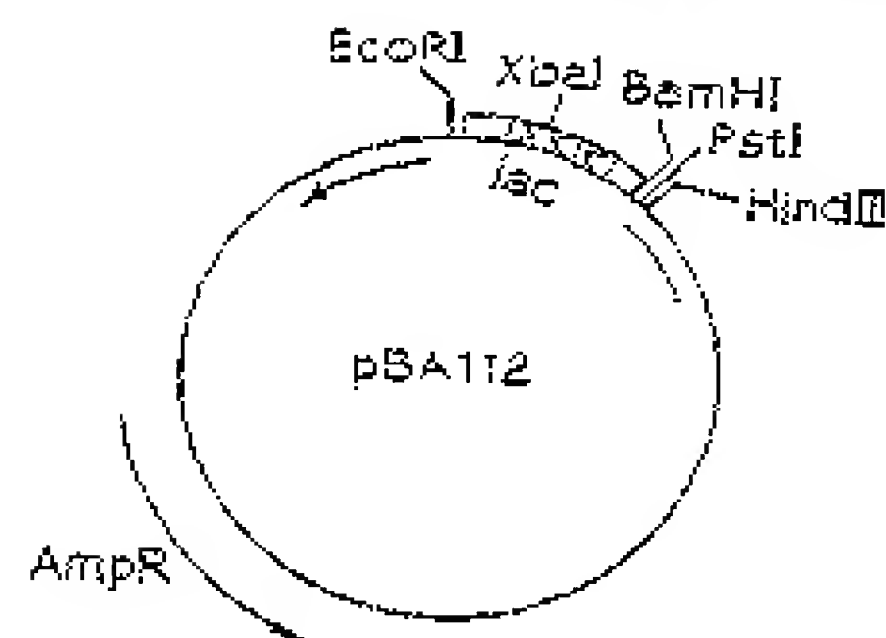


Fig. 1

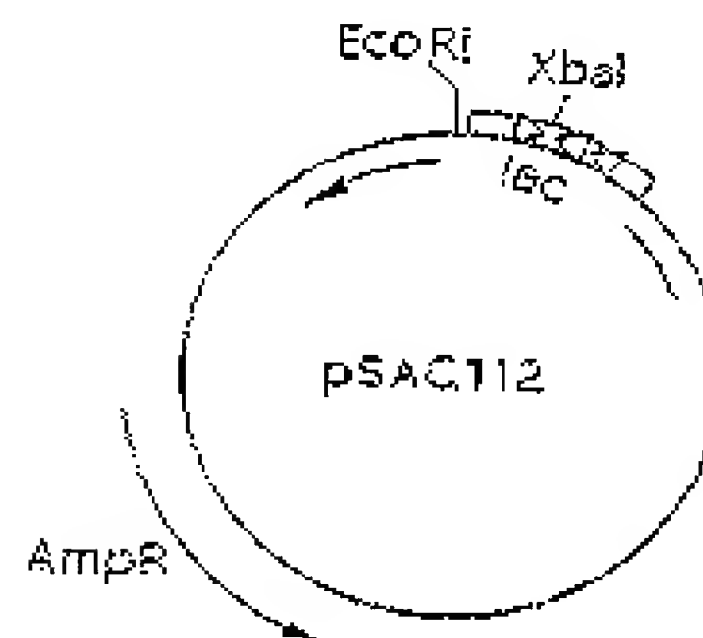


Fig. 2

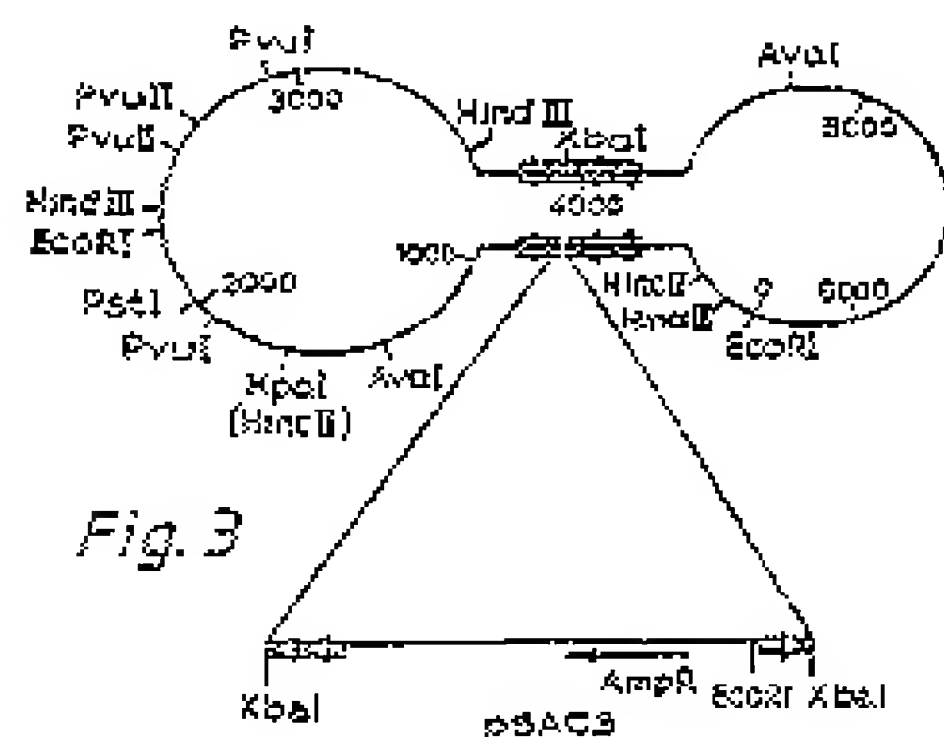


Fig. 3

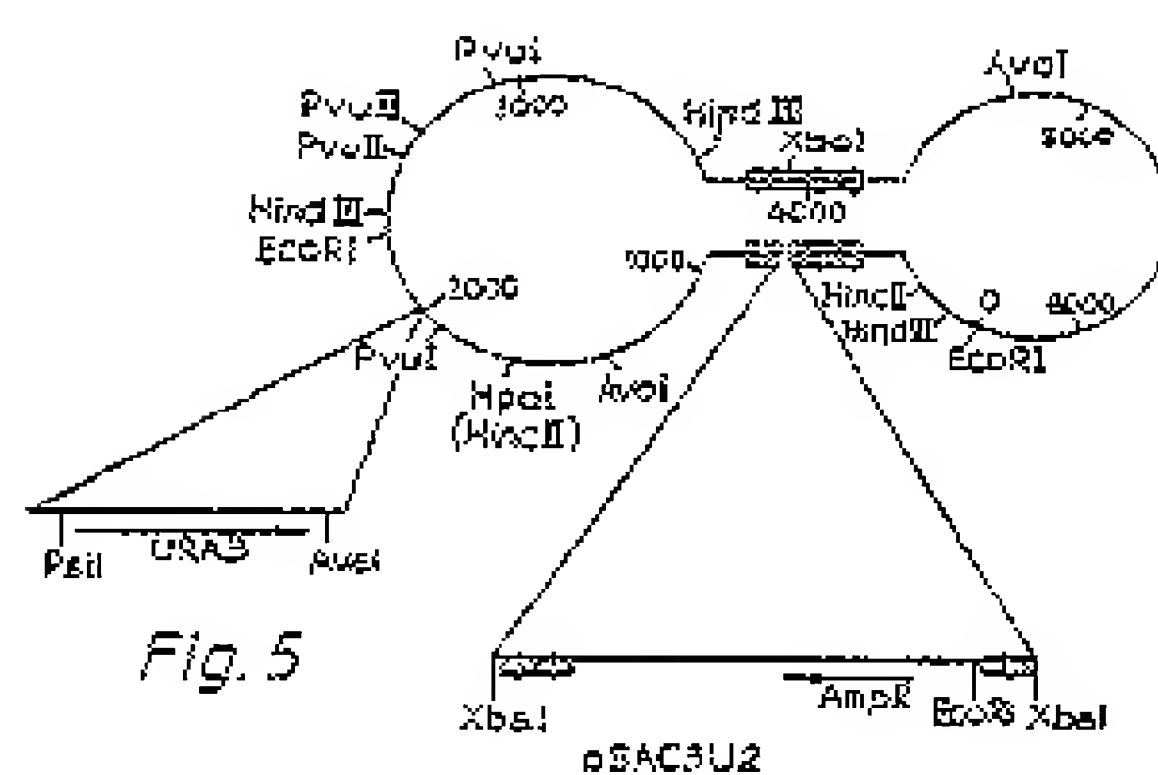


Fig. 5

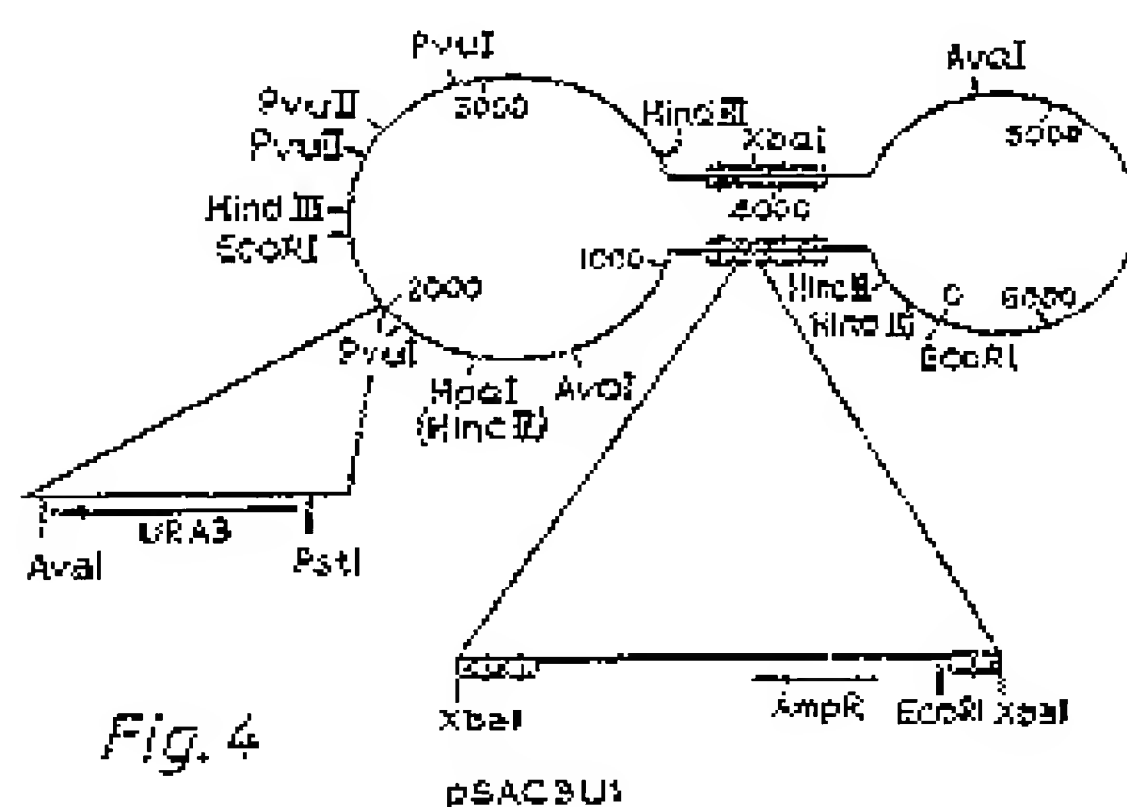


Fig. 4

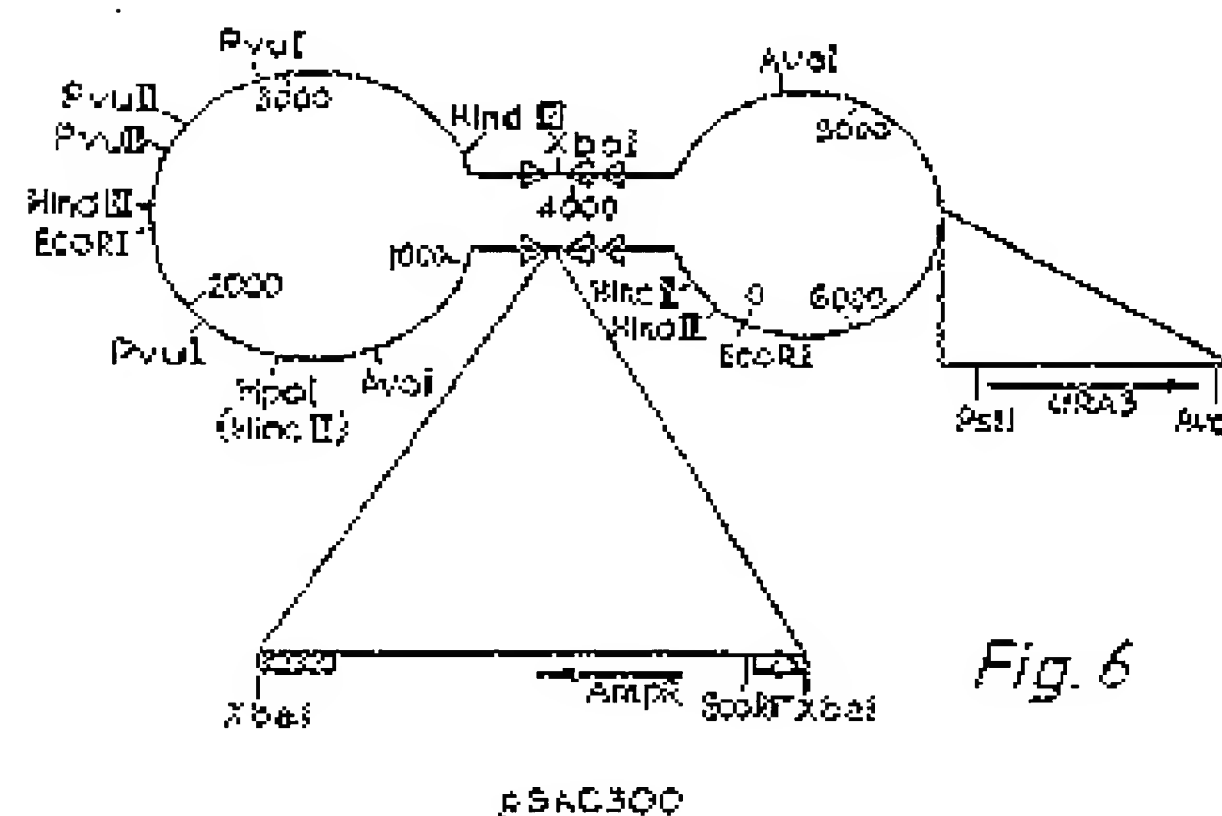


Fig. 6

Fig. 9  $URA^+$  &  $bla^+$  の遺伝的結合

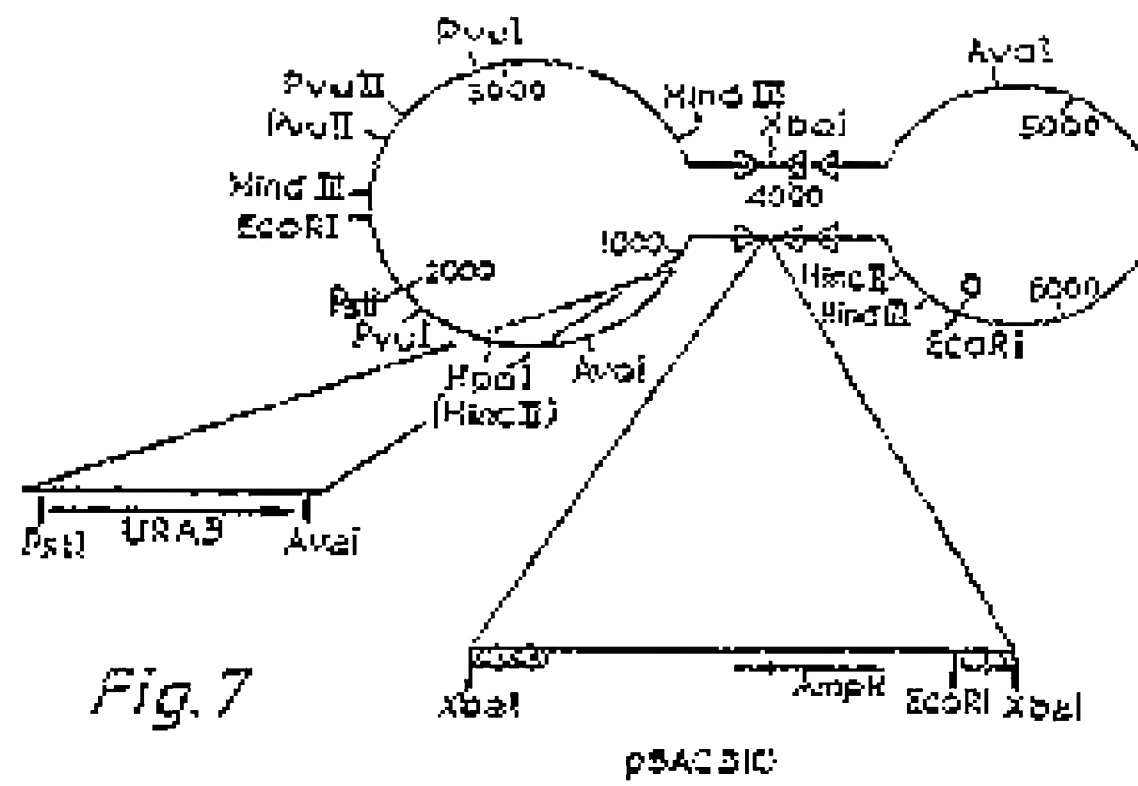


Fig. 7

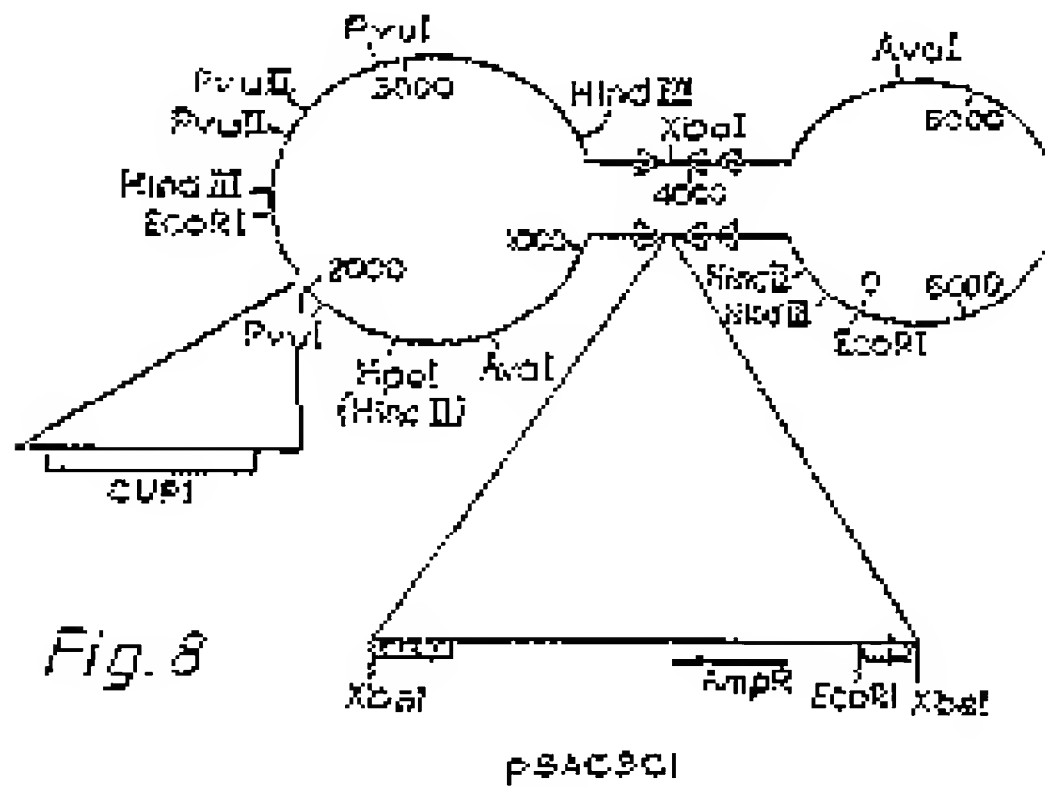


Fig. 8

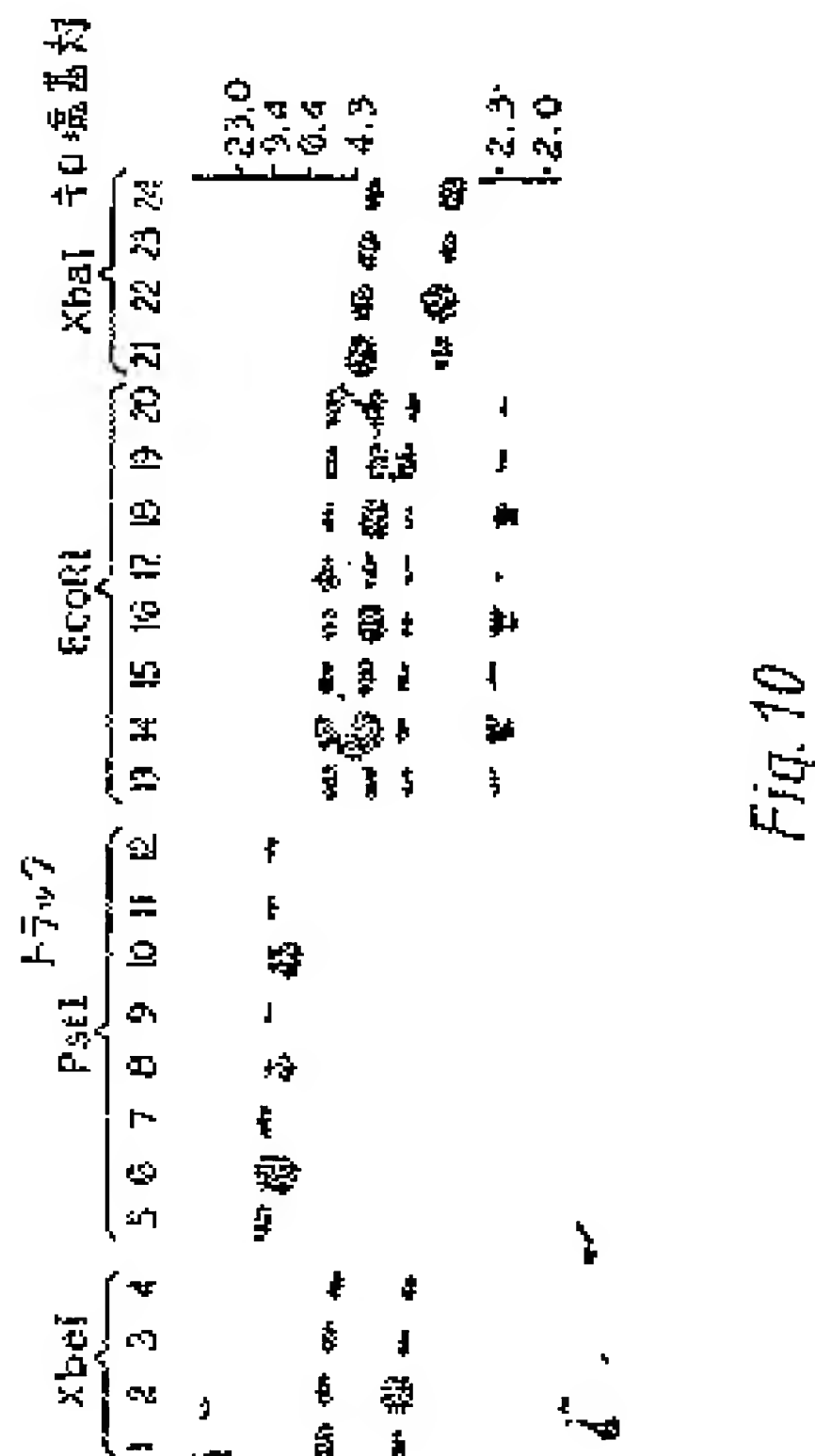
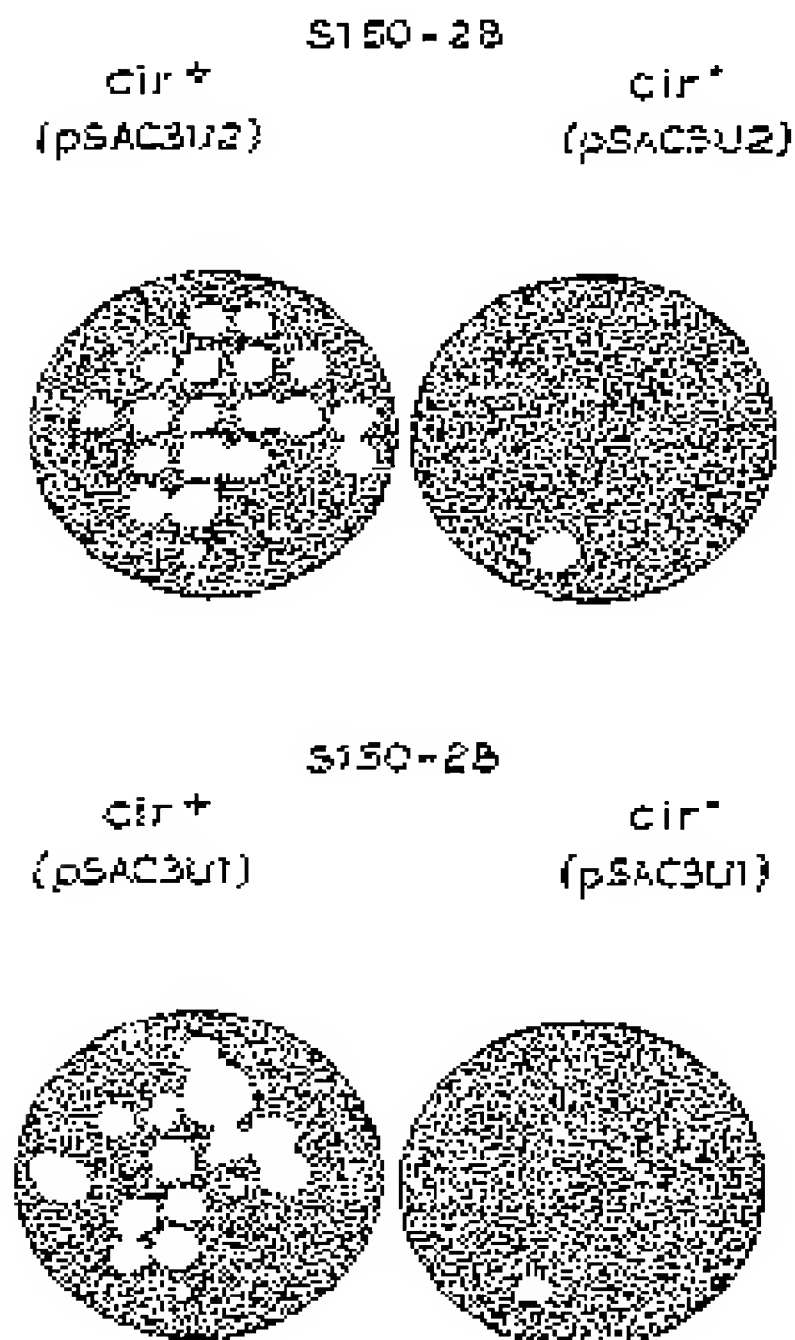


Fig. 10

国際調査報告

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER International Classification of Diseases, 10th Revision C 32 N 1/16; C 32 P 31/02	
2. SOURCE OF INFORMATION C 32 N	
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
A. Current topics in Microbiology and Immunology, vol. 85, 1982, Springer Verlag (Berlin, DE). C.V. Hollenberg: "Cloning with 3-mum DNA vectors and the expression of foreign genes in Saccharomyces cerevisiae", see pages 127-129	1-3, 11-15
B. EP, A, 0202229 (DETA HIGHTECHNOLOGY) 11 November 1986. See claims cited in the application	7, 8
C. WO, A, 03/02096 (GENETICA INSTITUTET) 31 May 1987. See claims 27-28; page 13, line 22 - page 18a, line 31	1-3, 11, 14, 15
D. Plasmid, vol. 17, no. 1, 1987 (New York, US). C.V. Brumby: "A new system for in vivo study of the yeast 3-mum DNA plasmid", see page 78	1-3, 11, 14, 15
4. CERTIFICATION 29th June 1988 EUROPEAN PATENT OFFICE	
5. SIGNATURE 27. 07. 88 M. VAN MOEL	



14-00000-78 CONTINUED TO 24 AUGUST 87 IDENTIFIED FROM THE SECOND SHEET		Page 11 of 11
Category	Category Description and Location of the Material and the Date of the Page	Page 11 of 11
A	<p>22. A. 0147198 (BASS PUBLIC ID) 3 July 1988, sec 111111; page 11, line 25 - page 28, line 28</p> <p>----</p>	9

Page 487 of 526
Page 487 of 526

This report and the information contained herein is the property of the FBI and is loaned to your agency; it and its contents are not to be distributed outside your agency.

Person and dates report on (include report)	Publication date	Source (agency numbering)	Publication date
EP-A- 0203229	12-11-86	GS-A- 2175390 JP-A- 61252057 JC-A- 8441836	91-12-86 12-12-86 05-12-87
WC-A- 6705006	21-05-87	AO-A- 8175097 SP-A- 0245483	02-08-87 05-11-87
EP-A- 0167198	05-07-86	AU-A- 3706184 JP-A- 00260906	12-07-85 12-12-86

**RESEARCH**

For more general issues, contact: [web@CrisisJournal.nl](mailto:web@CrisisJournal.nl) or the European Helpline Office, 2004

第 1 頁の続き

優先權主張

② 發明者

④1987年8月3日④イギリス(GB)④8718347

チネライ, シモン アンドリュ

イギリス国 エヌジ-13 8イーディー、ノッティンガムシャー、  
ピンガム、マスターズ ロード、4